

ANYPLEX^{TM} II Detección de MTB/MDR/XDR

Sistema PCR Multiplex para la detección simultánea de *Mycobacterium tuberculosis* y su resistencia ante drogas antituberculosas de primera línea (isoniacida y rifampicina) y segunda línea (fluoroquinolonas y drogas inyectables) basados en el análisis de temperaturas de fusión.

Para usar con el termociclador de tiempo real: CFX96^{TM} de Bio-Rad.



TABLA DE CONTENIDO



NOTAS:

- Este producto es para uso en diagnóstico in vitro. IVD
- Esta prueba ha sido validada para los siguientes tipos de muestras: Escobillones cervicales y muestras de citología líquida. Esta prueba no ha sido validada en otros tipos de muestras.
- Almacene las muestras de ADN a -70°C y mantenga en hielo mientras las usa.
- La sensibilidad de un ensayo puede decrecer si se congela y descongela repetidamente las muestras y se almacenan por un largo periodo de tiempo.
- La confiabilidad de los resultados depende de la adecuada toma de muestra, del transporte, almacenamiento y ejecución del procedimiento.
- El flujo de trabajo en el laboratorio debe proceder unidireccionalmente.
- Siempre use guantes desechables en cada área y cámbielos antes de entrar en diferentes áreas. Cambie los guantes inmediatamente si estos se contaminan o trátelos con un reactivo descontaminante de ADN.
- Dedique consumibles y equipo a cada área de trabajo y los mueva de un área a otra.
- No pipetee con la boca.
- No coma, beba o fume en el laboratorio. Use guantes libres de polvo, batas de laboratorio, y gafas de protección cuando manipule muestras y reactivos. Lave sus manos vigorosamente después de manipular reactivos y muestras.
- Evite contaminación cuando tome alícuotas de los reactivos. Se recomienda el uso el uso de puntas desechables estériles resistentes a aerosoles.
- No mezclar reactivos de diferentes lotes o de diferentes tubos del mismo lote.
- No use el producto después de su fecha de expiración.
- Use tubos tapa rosca y evite cualquier tipo de contaminación cruzada de las muestras durante las preparaciones.
- Por favor tenga cuidado de no contaminar las muestras con ADN extraído, productos de PCR, controles positivos. Para prevenir la contaminación de las muestras se recomienda el uso de puntas con filtro.
- Use áreas separadas para cada experimento.
- Use un set diferente de pipetas para cada área: extracción de ADN, mezcla de reactivos, y post-PCR.
- Después de la amplificación abra los tubos o tiras de reacción en la zona de post-PCR, para evitar contaminación con amplicones.
- Almacene el material positivo aparte de los reactivos del kit.
- Los procedimientos de seguridad en el laboratorio se deben tener en cuenta para manipular las muestras.
- Limpie y desinfecte a fondo todas la superficies de trabajo con hipoclorito de sodio al 0.5% (en agua desionizada o destilada)



PROPOSITO DE USO

El kit Anyplex II MTB/MDR/XDR para la detección simultánea de *Mycobacterium tuberculosis* y su resistencia ante drogas antituberculosas de primera línea (isoniacida y rifampicina) y segunda línea (fluoroquinolonas y drogas inyectables) en esputo, cultivo, tejido fresco, o lavados broncos alveolares de pacientes sintomáticos. Cubre 7 mutaciones que causan resistencia a Isoniacida en el gen *KatG* y en la región promotora *inhA*, 18 mutaciones que causan resistencia a Rifampicina en el gen *rpoB*, 7 mutaciones que causan resistencia a fluoroquinilonas en el gen *gyrA* y 6 mutaciones que causan resistencia a drogas inyectables en el gen rrs y en la región promotora *eis.*

PRINCIPIO Y PROCEDIMIENTO

1. **Principio:**

Seegene tiene dos tecnologías patentadas relacionadas con PCR: Dual Priming Oligonucleotide (DPO ™) y la tecnología TOCE™. La tecnología DPO es una herramienta fundamental para bloquear la amplificación ni específica de la plantillas, permitiendo que el diseño y desarrollo de ensayos que tengan una alta especificidad. La fuerza y la utilidad de la tecnología DPO™ puede ser incorporada con éxito en los sistemas de diagnóstico molecular, tales como ensayos multiplex moleculares y ensayos para la detección de mutaciones puntuales. TOCE ™ es una nueva tecnología para el tiempo real de lectura que se basa en el análisis de temperatura de fusión. Hasta ahora, los análisis de temperaturas de fusión se han visto limitados por varias causas inherentes - es decir, diseño restringido de las sondas, la incapacidad de realizar detecciones múltiples de mayor numero de blancos de manera eficiente, y la alta sensibilidad de las temperaturas de fusión debido a la variación de la secuencia de la sonda. La tecnología TOCE ™ supera estas limitaciones al aumentar la capacidad multiplex del ensayo, mejorando la flexibilidad en el diseño de la sonda, proporcionando una lectura que es independiente de la variación de la secuencia diana y la compatibilidad entre plataformas. La combinación de las tecnologías DPO y TOCE ™ permite la detección simultánea en tiempo real de mutaciones puntuales múltiples con alta especificidad.

El kit Anyplex ™ II MTB / MDR / XDR Detection es una prueba múltiplex en PCR por tiempo real que permite la amplificación simultánea y la detección de secuencias diana de Mycobacterium tuberculosis (MTB), 7 mutaciones que causan resistencia isoniacida (INH) [katG S315i (ATC), S315N (AAC), S315T (ACC), S315T (ACA), inhA promotor -15 (T), -8 (A), -8 (C)], 18 mutaciones que causan resistencia a rifampicina (RIF) [rpoB L511P (CCG), Q513K (AAA), Q513L (CTA) Q513P (CCA), 3 aminoácidos supresión en 513 ~ 516, D516V (GTC), D516Y (TAC), S522L (TTG), S522Q (CAG), H526C (TGC), H526D (GAC), H526L (CTC), H526N (AAC), H526R (CGC), H526Y (TAC), S531L (TTG), S531W (TGG), L533P (CCG)], 7 mutaciones que causan

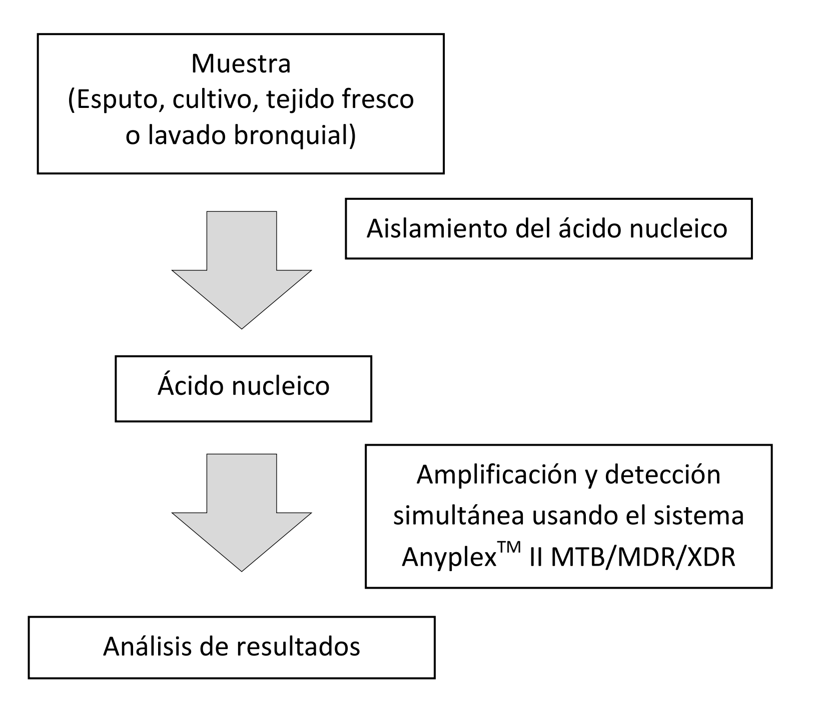
resistencia a fluoroquinolonas (FQ) [gyrA A90V (GTG), S91P (CCG), D94A (GCC), D94G (GGC), D94H (CAC), D94N (AAC), D94Y (TAC)], y 6 mutaciones que causan resistencia a drogas inyectables [RR 1401 (G), 1402 (T), 1484 (T), promotor eis -37 (T), -14 (T), -10 (A)], y el control interno (IC).

El kit Anyplex ™ II MTB / MDR / XDR Detection, incluye un Control Interno que se agrega para comprobar las muestras procesadas y verificar que contengan sustancias que pueden interferir con la amplificación por PCR.

La especificidad de los oligos utilizados para detectar las mutaciones en el kit Anyplex MTB ™ II / MDR / XDR Detection, se puede confirmar por el control tipo silvestre de control (WTC). Este control está diseñado para mostrar el mismo patrón de muestras de M.tuberculosis susceptibles a drogas. La reacción del control tipo silvestre se debe siempre realizar en cada corrida, y el resultado de las muestras desconocidas se analiza sobre la base del resultado de este control.

El sistema UDG (uracil-DNA glycosilasa (UDG)-dUTP) se emplea en el kit Anyplex ™ II MTB / MDR / XDR Detection: Este sistema se utiliza comúnmente cuando se realiza PCR para eliminar la contaminación por el arrastre ya que la UDG elimina residuos de uracilo del ADN por escisión del enlace Nglycosílico.

2. PROCEDIMIENTO





INFORMACION GENERAL

1. Tuberculosis:

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa bacteriana causada por *Mycobacterium tuberculosis* y es conocida por transmitirse a través del aire. Cuando las personas infectadas tosen, escupen, o hablan, los organismos de *M. tuberculosis* se dispersan en el aire. Sólo un pequeño número de M. tuberculosis es suficiente para causar una infección cuando se inhala. Sin embargo, no todas las personas infectadas con el *M. tuberculosis* se enferman, el sistema inmunitario mata o limita a los gérmenes en donde pueden permanecer latentes durante años. El fallo del sistema inmune para controlar la infección con *M. tuberculosis* conduce a la enfermedad activa. Tuberculosis y síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) constituyen una combinación letal. El SIDA debilita el sistema inmunológico. Una persona que es positiva para el VIH y está infectada con *M. tuberculosis* tiene muchas más probabilidades de enfermar de tuberculosis que alguien que es VIH-negativo e infectada con *M. tuberculosis*.

2. La tuberculosis resistente a los medicamentos

Cuando una persona con tuberculosis infectada se identifica, el tratamiento con medicamentos anti-tuberculosos debe comenzarse. El más común de los medicamentos antituberculosos de primera línea, son isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol. Las cepas que son resistentes a una sola droga se han documentado en todos los países estudiados, lo que es más, han venido surgiendo cepas de *M. tuberculosis* resistentes a todos los principales medicamentos antituberculosos. . Una forma particularmente peligrosa de la tuberculosis farmacorresistente es la tuberculosis multirresistente (MDR-TB), que se define como la enfermedad causada por M. tuberculosis resistente a por lo menos a dos de los más eficaces y comúnmente usados medicamentos contra la tuberculosis, la isoniacida y la rifampicina. MDR-TB está presente en prácticamente todos países estudiados por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

La tuberculosis ampliamente resistente a los medicamentos (XDR-TB), es un tipo relativamente raro de multiresistencia, presenta resistencia a la isoniacida, la rifampicina, más resistencia a cualquier fluoroquinolona y al menos uno de tres medicamentos inyectables de segunda línea (amikacina, kanamicina, y capreomicina). En julio de 2010, 58 países y territorios informaron al menos un caso de XDR-TB.

3. El diagnóstico de la tuberculosis y la tuberculosis resistente a los medicamentos

El diagnóstico rápido y preciso de los pacientes sintomáticos es la piedra angular de las estrategias para el control mundial de la tuberculosis. La tuberculosis activa se diagnostica actualmente por un total de evaluación de los síntomas, los signos clínicos y los resultados de las pruebas. Los métodos de diagnóstico de prueba para tuberculosis incluyen la radiografía de tórax (rayos X), microscopía (tinción de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), el cultivo y el diagnóstico

molecular. Junto al cultivo como la técnica de referencia, los métodos de diagnóstico molecular basados en PCR son ampliamente utilizados para el diagnóstico precoz de la tuberculosis.

La detección de resistencia a los medicamentos antes de iniciar una quimioterapia inapropiada, rescata la morbilidad, mortalidad, los costos económicos y el tratamiento innecesario con medicamentos ineficaces. Los métodos de rutina para las pruebas de susceptibilidad a fármacos (DST), técnica de referencia para el diagnóstico de resistencia a los medicamentos anti tuberculosos, son lentos y poco habituales en entornos con recursos limitados. El hecho de que a menudo toma varias semanas obtener un resultado, retrasa la instauración de un tratamiento eficaz, lo que ha aumentado el riesgo que cepas de M. tuberculosis resistentes a drogas se transmitan a los contactos. Además, los pacientes pueden recibir terapia inadecuada que amplifica aún más la resistencia y compromete la probabilidad de un resultado exitoso del tratamiento. Por lo tanto, el diagnóstico preciso, rápido y sencillo es necesario para una detección eficaz y proporcionar una ayuda útil para un tratamiento clínico adecuado en la lucha mundial contra la tuberculosis.

Los recientes avances en DST fenotípica incluyen el uso de indicadores de crecimiento de micobacterias y los ensayos basados en fagos. Aunque estos métodos son capaces de informar la resistencia fenotípica en 2 a 10 días, el cultivo de microrganismos viables de *M. tuberculosis* viables plantea un riesgo de salud para el personal de laboratorio por lo que requiere altos niveles de bioseguridad. Para superar estas limitaciones y para mejorar la velocidad de detección de resistencia a los medicamentos, numerosos métodos basados en PCR han sido reportados.

Sin embargo, el número de diferentes polimorfismos de nucleótidos simples no sinónimos (nsSNPs) que confieren resistencia sigue siendo un desafío importante para el desarrollo exitoso de métodos de genotipificación. Además, muchos de estos métodos basados en la PCR se ven obstaculizados por la necesidad para el procesamiento posterior para permitir la detección de nsSNPs dentro del dominio amplificado por PCR

(Por ejemplo, hibridación con oligonucleótidos inmovilizados, microarreglos, dot-blot, hibridación, desnaturalización cromatografía líquida de alto rendimiento, y la secuenciación del ADN).

En el kit Anyplex ™ II Detección de MTB / MDR / XDR, cada mutación resistente a los fármacos diana se amplifica y es detectado específicamente por los oligos correspondientes dentro de 3 horas mediante la aplicación de las tecnologías DPO ™ y TOCE™ de Seegene sin necesidad de realizar otro procedimiento posterior adicional. Las mutaciones blanco del kit Anyplex ™ II Detección de MTB / MDR / XDR se resumen en la siguiente tabla.



Mutaciones blanco del **Anyplex™ II MTB/MDR/XDR Detection**

Resistencia a Droga	Gen Relacionado	Mutaciones Blanco			
Isoniazid resistance (INH-R)	*katG*	S315I (AGC→ATC)	S315N (AGC→AAC)	S315T (AGC→ACC)	S315T (AGC→ACA)
	inhA promoter	-15 (C→T)	-8 (T→A)	-8 (T→C)	
Rifampicin resistance[1] (RIF-R)	*rpoB*	L511P (CTG→CCG)	Q513K (CAA→AAA)	Q513L (CAA→CTA)	Q513P (CAA→CCA)
		3 a.a. deletion in 513~516	D516V (GAC→GTC)	D516Y (GAC→TAC)	S522L (TCG→TTG)
		S522Q (TCG→CAG)	H526C (CAC→TGC)	H526D (CAC→GAC)	H526L (CAC→CTC)
		H526N (CAC→AAC)	H526R (CAC→CGC)	H526Y (CAC→TAC)	S531L (TCG→TTG)
		S531W (TCG→TGG)	L533P (CTG→CCG)		
Fluoroquinolone resistance (FQ-R)	*gyrA*	A90V (GCG→GTG)	S91P (TCG→CCG)	D94A (GAC→GCC)	D94G (GAC→GGC)
		D94H (GAC→CAC)	D94N (GAC→AAC)	D94Y (GAC→TAC)	
Injectable drug resistance (Inj. drug-R)	*rrs*	1401 (A→G)	1402 (C→T)	1484 (G→T)	
	eis promoter	-37 (G→T)	-14 (C→T)	-10 (G→A)	

[1] Additional nine mutations with the same mutation at the same base (underlined) are also detected: Q513N (CAA→AAT), D516F (GAC→TTC), D516V (GAC→GTG), H526F (CAC→TTC), H526G (CAC→GGC), H526L (CAC→CTG), H526L (CAC→CTT), H526S (CAC→AGC), and H526T (CAC→ACC).



REACTIVOS

Los reactivos que contiene el kit son suficientes para 50 reacciones.

Información para el pedido del Kit Anyplex II Detección MTB/MDR/XDR Catálogo TB7500Y

ANYPLEX II MTB/MDR/XDR			
SIMBOLO	**CONTENIDO**	**VOLUMEN**	**DESCRIPCION**
Primer	4X MTB/MDR TOM	250 UL	TOCE Oligo Mix (TOM):
			Reactivo para la amplificación y detección de MTB Y MDR
Primer	4X MTB/XDR TOM	250UL	TOCE Oligo Mix (TOM):
			Reactivo para la amplificación y detección de MTB Y XDR
Premix	4X Anyplex	250 ul x 2	ADN Polimerasa
	PCR Master Mix		UDG Uracil DNA Glicolasa
	(con UDG)		Tampón conteniendo dNTPS
CONTROL +	MTB/MDR/XDR PC	100 ul	Control Positivo
			Mezcal de clones y blancos positivos y control interno.
CONTROL W	MTB/MDR/XDR WTC	100 ul	Control Positivo
			Mezcal de clones de MTB tipo silvestre y control interno.
Water	Agua libre de DNA/RNasas	1000 ul	Ultrapura Grado PCR
			Control negativo: Agua esterilizada como control negativo.
DNA ES	Solución de Extracción de ADN	10 ml	Reactivo para la extracción de ADN bacteriano.
i	Manual de usuario		

Anyplex II es una marca comercial de Seegene.

ALMACENAMIENTO Y MANEJO

Los componentes del kit de detección Anyplex II MTB/MDR/XDR deben almacenarse a -20 °C. Todos los componentes son estables en condiciones de almacenamiento recomendadas hasta la fecha de caducidad que aparece en la etiqueta. Se debe evitar la descongelación y congelación, ya que esto puede reducir la sensibilidad. Si los reactivos se van a utilizar en forma intermitente, deben ser congelados en alícuotas.



MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS:

- NALC-NaOH (0.5% NALC, 2% NaOH, y 1.47% trisodium citrate) o 4% NaOH (1 N NaOH
- PBS 1X (pH 8.0)
- guantes desechable libres de polvo (de látex o nitrilo)
- Pipetas (ajustable) y puntas de pipeta estériles
- Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Kit de aislamiento de ácido nucleico (ver aislamiento del ácido nucleico)
- Ice Maker
- Centrífuga de mesa
- Vortex mezclador
- Sistema CFX96TM PCR en tiempo real (Bio-Rad)
- Tapas en tira, ópticas, planas x 8 (Cat. No. TCS0803, Bio-Rad)
- Tiras de 8 tubos sin tapas (color blanco, ref. Núm TLS0851, Bio-Rad)
- Plato de 96 pozos para PCR, blanco (art. HSP-9655, Bio-Rad)

PROTOCOLO

TOMA DE MUESTRA, ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE:

Nota: Todas las muestras tienen que ser tratadas como materiales potencialmente infecciosos. Sólo las muestras que sean recogidas, transportadas y almacenadas y atiendan estrictamente las siguientes normas e instrucciones, serán permitidas:

A. Toma de Muestra:

Esputo:

- Dar instrucciones claras a los pacientes cuando tomen muestras de esputo. Los pacientes deben recoger muestras, bien fuera en el aire libre o lejos de otras personas. Los pacientes no deben recoger estas muestras en espacios cerrados como inodoros.
- Lavar la boca con agua, pero no cepillarse los dientes antes de recoger el esputo. Los pacientes deben toser profundamente para expectorar esputo directamente en el recipiente.
- Una muestra de esputo debe tener un volumen de 3 ~ 5 ml.

Cultivos Sólidos (Ogawa):

- Las muestras pueden analizarse tan pronto como el crecimiento sea visible y durante los siguientes 60 días de incubación.
- Las colonias se pueden recoger con un asa plástica desechable o aguja. Evite tomar medio.

Medio líquido (MGIT):

- Los tubos indicadores de crecimiento de micobacterias (MGITs) se examinan con luz UV diariamente para observar fluorescencia naranja brillante en el fondo del tubo que se refleja en el menisco. Una vez se observe esta señal positiva, se pipetea 500 ul del medio, tomados de la parte inferior del tubo.

Tejido fresco

- Cualquier tejido a ensayar se deben recoger asépticamente en un contenedor estéril sin fijadores, ni conservantes. No coloque muestra de tejido en formalina.
- Si se seca el espécimen, agregar solución salina estéril para mantener la humedad. Mantener refrigerado hasta su traslado.

Lavado bronquial

- El Lavado bronquial debe ser asépticamente recogido en un recipiente estéril por el médico utilizando técnicas de aspiración o procedimientos quirúrgicos.

B. Almacenamiento de muestras

La sensibilidad de un ensayo puede disminuir si se congela y descongela repetidamente las muestras o si se almacenan por largos periodos de tiempo.

Mantenga las muestras refrigeradas a 4 ° C durante hasta 72 horas antes del procesamiento. Guarde las muestras restantes ≤ -70 ° C.

C. Transporte de muestras

Para garantizar una alta calidad de la muestra, se deben ser transportadas tan pronto como sea posible en la temperatura indicada

- Empaque las muestras cuidadosamente para evitar fugas y roturas.
- Las muestras deben ser transportados en frío.
- Las muestras deben enviarse al laboratorio tan pronto como sea posible después de su recolección de acuerdo a las instrucciones de laboratorio para el transporte. Las muestras deben ser también transportadas según las disposiciones locales y nacionales para el transporte de materiales patógenos.

2. Tratamiento previo de las muestras de esputo:

- Añadir un volumen igual de NALC-NaOH (0,5% de NALC, 2% de NaOH, y 1,47% de citrato trisódico) a la muestra en el recipiente de esputo y agitar durante 1 minuto.

Nota: 4% de NaOH (1 N NaOH) se puede utilizar en lugar de NALC-NaOH.

- Se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Transferir 1,5 ml a un tubo nuevo estéril y se centrifuga a 15.000 x g (13.000 rpm) durante 5 minutos.
- Descartar el sobrenadante, añadir 1 ml de solución PBS 1X, y mezclar bien.
- Se centrifuga a 15.000 x g (13.000 rpm) durante 5 minutos y se desecha el sobrenadante con pipeta.
- Añadir 1 ml de 1X solución de PBS y mezclar bien.
- Se centrifuga a 15.000 (13.000 rpm) durante 5 minutos y se desecha el sobrenadante con pipeta.

Tejido fresco

- cortar o macerar muestra de tejido en un recipiente estéril.
- Suspender con 1 ml de PBS 1X.
- Se centrifuga a 15.000 (13.000 rpm) durante 5 minutos y se desecha el sobrenadante con pipeta.

i

Lavado bronquial

- Sin añadir NALC-NaOH, centrifugar 1,5 ml de la muestra a 15.000 (13.000 rpm) durante 5 minutos.
- Desechar el sobrenadante, añadir 1 ml de solución PBS 1X, y mezclar bien.
- Se centrifuga a 15.000 (13.000 rpm) durante 5 minutos y se desecha el sobrenadante con pipeta.

3. Extracción de ácidos nucleicos

La Solución de Extracción de ADN está incluida en el kit de detección Anyplex ™ II MTB / MDR / XDR.

Todas las muestras excepto, muestras de cultivo

- (Opcional) Agregue 1 ml de agua estéril para la preparación de sedimentos, centrifugar a 15.000 (13.000 rpm) durante 5 minutos, y desechar el sobrenadante con una pipeta.
- Añadir 100 l de solución de extracción de ADN a los sedimentos y de vórtice durante 30 segundos.
- Cierre la tapa del tubo con un tapón de bloqueo y dejar hervir durante 20 minutos en bloque de calentamiento.
- Se centrifuga a 15.000 (13.000 rpm) durante 5 minutos.
- Use 5 ul del sobrenadante como molde de PCR.

Medio de Cultivo Sólido

- Suspender una colonia con 200 ul de solución de extracción de ADN en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
- Mezcle en Vortex durante 30 segundos.
- Cierre la tapa del tubo con un tapón de bloqueo y deje hervir durante 20 minutos en bloque de calentamiento.
- Se centrifuga a 15.000 (13.000 rpm) durante 5 minutos.
- Use 5 ul del sobrenadante como molde de PCR.

Medio Líquido (MGIT)

- Transferir 0,5 ml del cultivo de la parte inferior a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
- Se centrifuga a 15.000 (13.000 rpm) durante 5 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y añadir 200 ul de solución de extracción de ADN al pellet
- Mezclar en Vortex durante 30 segundos.
- Cierre la tapa del tubo con un tapón de bloqueo y dejar hervir durante 20 minutos en bloque de calentamiento.
- Se centrifuga a 15.000 (13.000 rpm) durante 5 minutos.
- Use 5 ul del sobrenadante como molde de PCR.

4. Preparación para la PCR en tiempo real

Nota: Los tubos y las tapas correctas deben ser utilizados (ver Materiales necesarios pero no proporcionados.)

Nota: Use puntas con filtro y guantes ajustados para la preparación de muestras. Utilizar con cuidado extremo para asegurar que no se presente contaminación cruzada.

Nota: descongelar completamente los reactivos en hielo.

Nota: Centrifugar los tubos de reactivos para retirar las gotas de la tapa interior.

Nota: Cada muestra será probado simultáneamente en dos reacciones separadas (MTB / MDR y MTB / XDR)

A. Preparación de la Mezcla Maestra

5 ul 4X MTB/MDR TOM o 4X MTB/XDR TOM
5 ul 4X Anyplex PCR Master Mix (con UDG)
5 ul Agua libre de Rnasa
15 ul Volumen total de Mezcla Maestra PCR

Nota: Calcular la cantidad necesaria de cada reactivo, basándose en el número de reacciones (muestras y controles).

B. Mezclar por inversión 5 veces o por vórtex rápido, y centrifugar brevemente.
C. Alícuota 15 ul de la mezcla maestra de PCR en tubos PCR y cerrar las tapas.
D. Añadir 5 ul de ácidos nucleicos de cada muestra con el tubo

15 ul Mezcla maestra de PCR
5 ul de Muestra de ácido nucleico
20 ul Volumen Total de Reacción

Nota: Utilice una nueva punta de pipeta estéril para cada muestra.

Nota: Para el control negativo, utilice 5 ul de agua libre RNasas en lugar de ácido nucleico.

Nota: Para el control positivo, utilice 5 ul de MTB/MDR/XDR PC en vez de muestra de ácido nucleico.

Nota: Para el control tipo silvestre, utilice 5 ul de MTB/MDR/XDR WTC en vez de muestra de ácido nucleico.

Nota: La reacción de control tipo silvestre debe ser siempre realizada cada ejecución de las pruebas, y el resultado resistente a los fármacos de muestras desconocidas se analizan sobre la base del resultado del control tipo silvestre.

Nota: Por favor, tenga cuidado de generar contaminación cruzada de la mezcla maestra de PCR y las muestras con el control positivo.

Nota: En caso del CFX96, no marcar la tapa de los tubos de reacción ya que la fluorescencia se detecta a través de la tapa.



Símbolo	Explicación
IVD	Para Diagnóstico in vitro
LOT	Número de Lote
REF	Número de catálogo
	Fecha de vencimiento
	Temperatura de Almacenamiento
	Precaución
PRIMER	Mezcla de oligonucleotidos para amplificación y detección
WATER	Agua libre de Rnasas
CONTROL +	Control Positivo
CONTROL W	Control tipo silvetre
PREMIX	Mezcla Maestra para PCR Anyplex
	Fabricante
	Fecha de fabricación
	Consulte instrucciones de uso



INSTRUMENTO PARA PCR EN TIEMPO REAL, CONFIGURACION Y ANALISIS DE RESULTADOS

1. Sistema PCR en tiempo real CFX-96 (BioRad)

1.1 Instalación Instrumento para PCR en tiempo real CFX-96

Nota: para el análisis de datos simple en el Visor de Seegene, ponga los tubos de reacción MTB / MDR en la columna 1 ~ 6 en el bloque y los tubos de reacción MTB / XDR en la columna 7 ~ 12 en el bloque.

Nota: La Configuración del programa para la detección MTB, INH-R, RIF-R, FQ-R, R-fármaco inyectable, y IC se puede dividir en tres pasos: configuración del protocolo, configuración de la placa, y ejecución.

A. Configuración del Protocolo:
   En el menú principal, haga click en protocolo para abrir la configuración del ensayo.

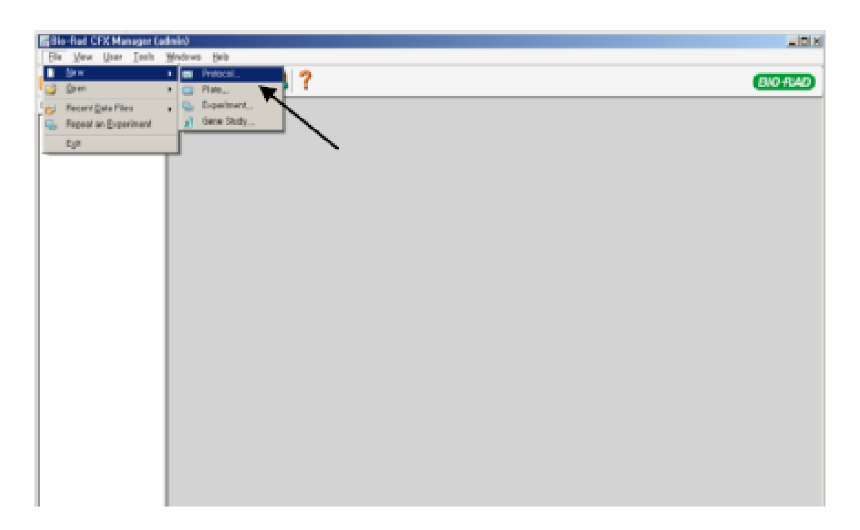


Figura 1. Configuración del protocolo. Crear un nuevo protocolo o cargar un protocolo existente para el experimento.

2.) En el editor del protocolo defina el perfil térmico como sigue:



Segment	No. of cycles	Temperature	Duration
1	1	95°C	15 min
2	50	95°C	30 sec
3		60°C	1 min
4		72°C	30 sec
5	1	55°C	30 sec
6	1	**Melting curve 55°C ~ 85°C (5 sec/0.5°C)**	

Lectura de placa en el segmento 6. La fluorescencia es detectada en fusión.

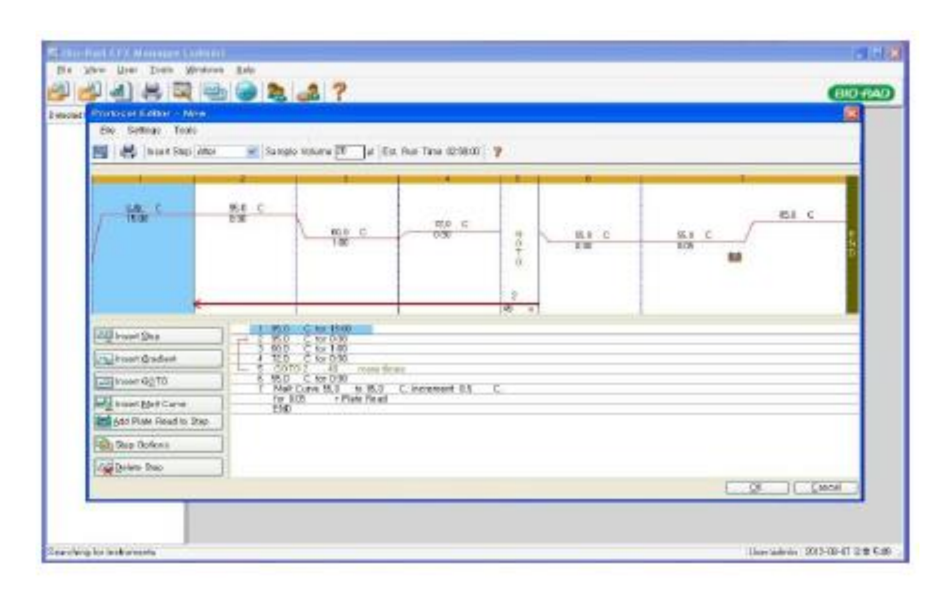


Figura 2. Edición del protocolo.

3.) Haga click sobre Volumen de muestra para editar directamente 20ul.

4.) Haga click en OK y guarde un archivo de nuevo protocolo.

5.) La ventana de configuración del experimento se abrirá.



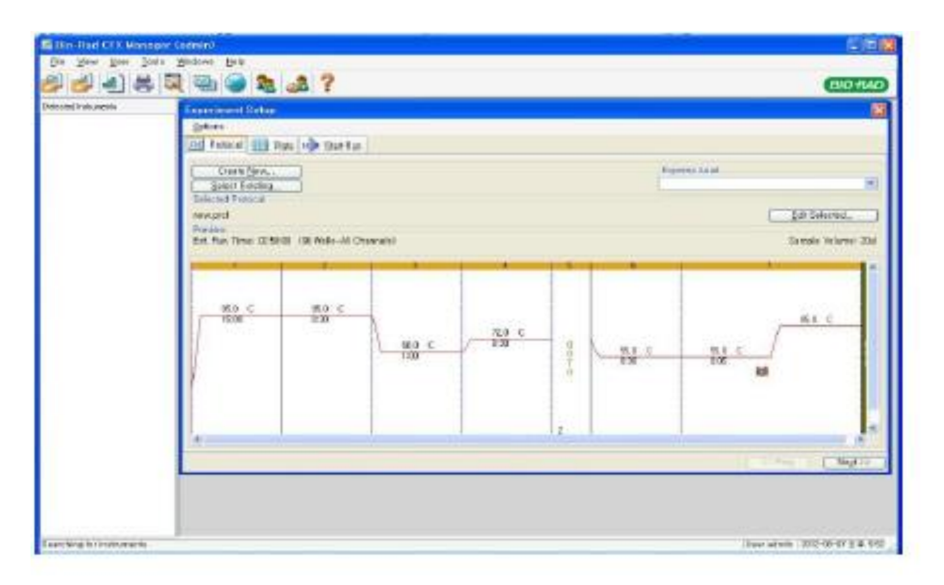


Figura 3. Protocolo de configuración del experimento.

B. Configuración de la Placa

1.) En Configuración de Placa del experimento, haga click en crear nuevo para abrir el editor de placa, para crear un nuevo plato.

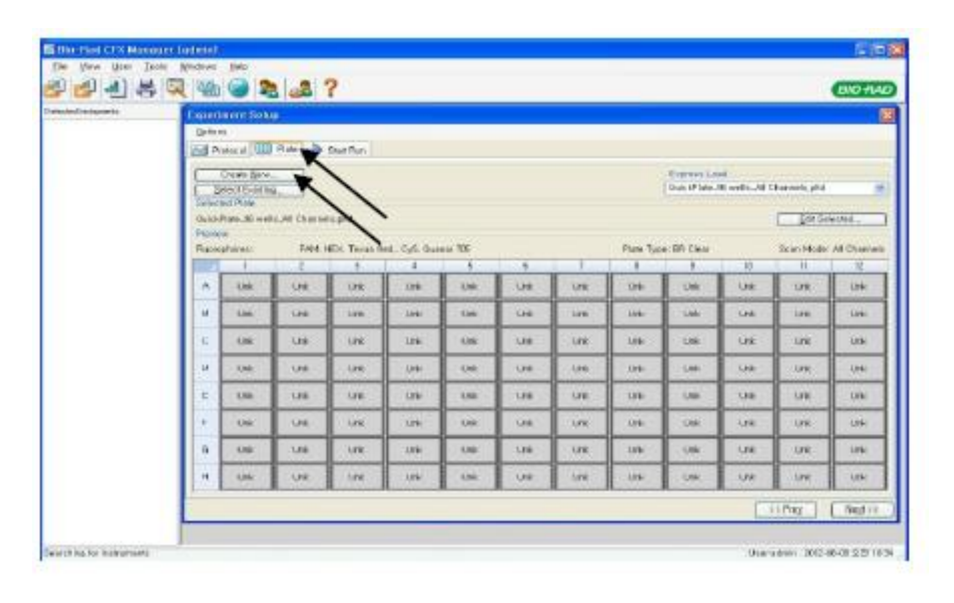


Fig.4. Editor de Plato. Crear un nuevo plato o cargar uno existente.



2.) Haga Click sobre selección de fluoroforo para indicar los fluoroforo (FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670 and Quasar 705) que serán usados en el experimento.

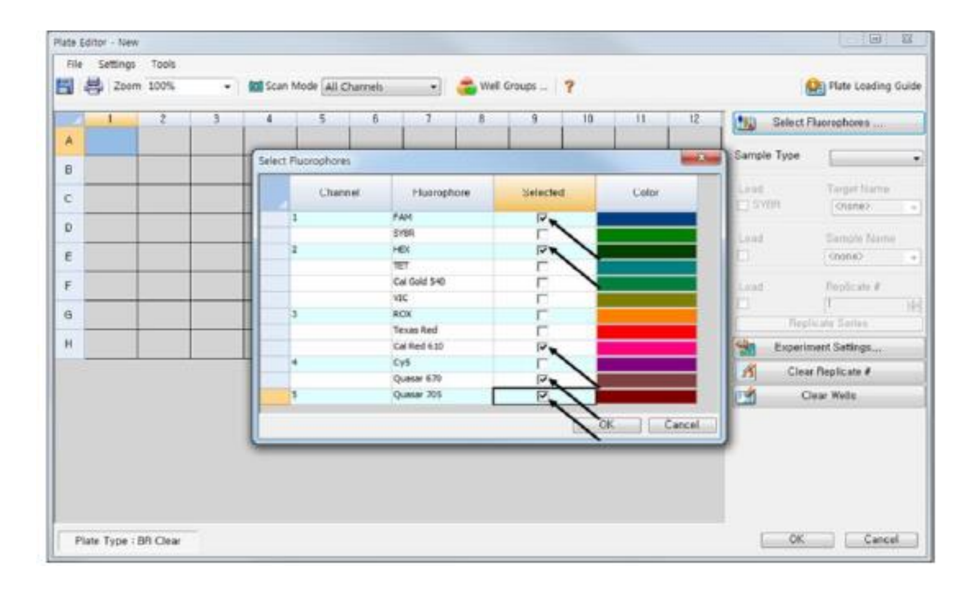


Fig.5 seleccionar fluoroforo. (FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670 and Quasar 705**)**

Escoja el pozo adecuado y haga click en tipo de muestra del menú desplegable.
- Desconocido: Muestra clínica y control tipo silvestre.
-Control Positivo
-Control negativo.
4.) Escoja las apropiadas casillas de verificación, para especificar el fluoroforo en los pozos seleccionados.
5.) Digite el nombre de la muestra y el control PC1, PC2, PC3 y presione la tecla enter.
Nota: En los casos del control tipo silvestre, se debe digitar el nombre correcto [MWTC (para la reacción MTB / MR) o XWTC (para la reacción MTB / XDR]
6.) En ajustes del menú principal del editor de plato, escoja tamaño de plato y tipo de plato.

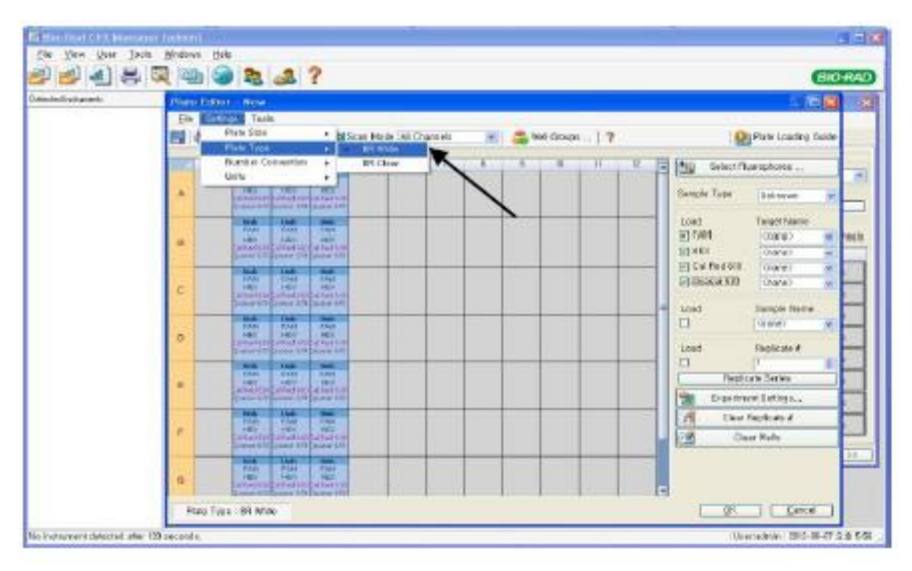


Fig. 6 Configuración de plato.



7.) Haga click en OK y guarde en un nuevo archivo de configuración de plato.
8.) La ventana de configuración de experimento se abrirá.

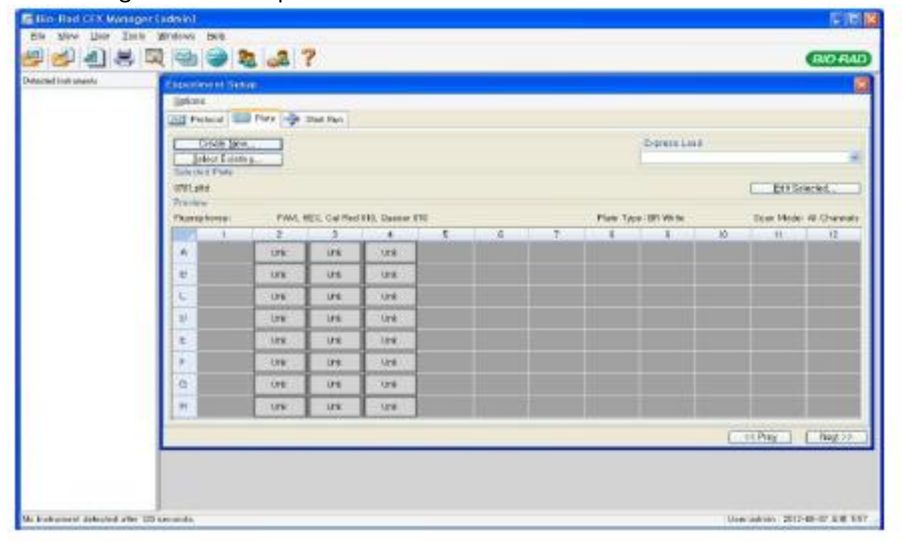


Figura 7. Configuración de plato del experimento.

C. INICIAR CORRIDO

1.) En experimento iniciar corrido de la configuración del experimento, hacer click en cerrar tapa, para cerrar la tapa.



Fig. 8 Cerrar la tapa.

1.) Hacer click en iniciar corrido.



2.) Almacene el archivo de corrido en mis documentos en el folder designado, llene el nombre del archivo, haga click en guardar y entonces la maquina iniciará

1.2 Análisis de datos:

A. Pre-ajustes en el CFX-96 para análisis de datos.

1. Después del ensayo, haga click en el campo curva de fusión para confirmar los resultados de los picos de fusión.

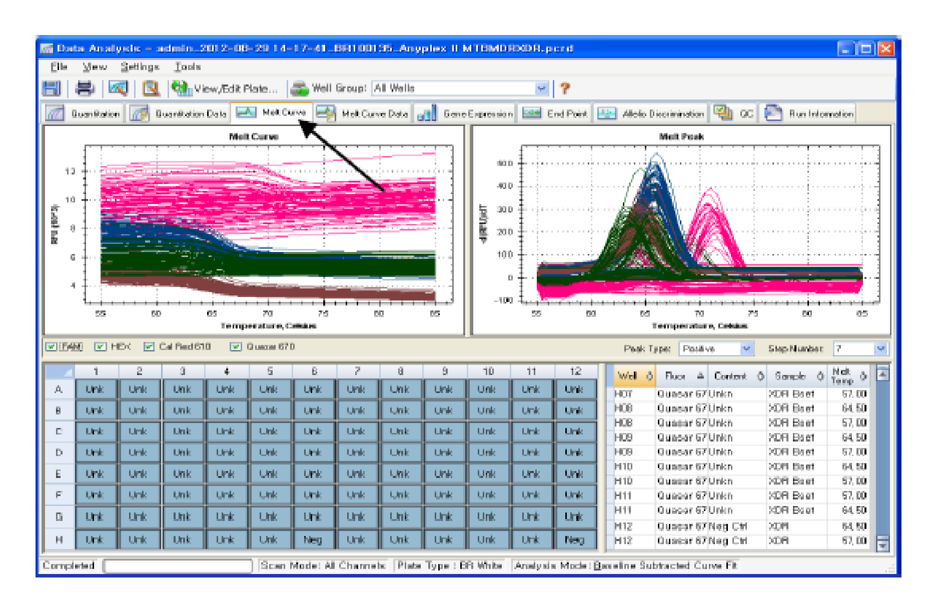




Fig. 9 Resultados Picos de fusión.

2. Seleccione solo Quasar 670, la franja umbral debe ser ajustada a cero.

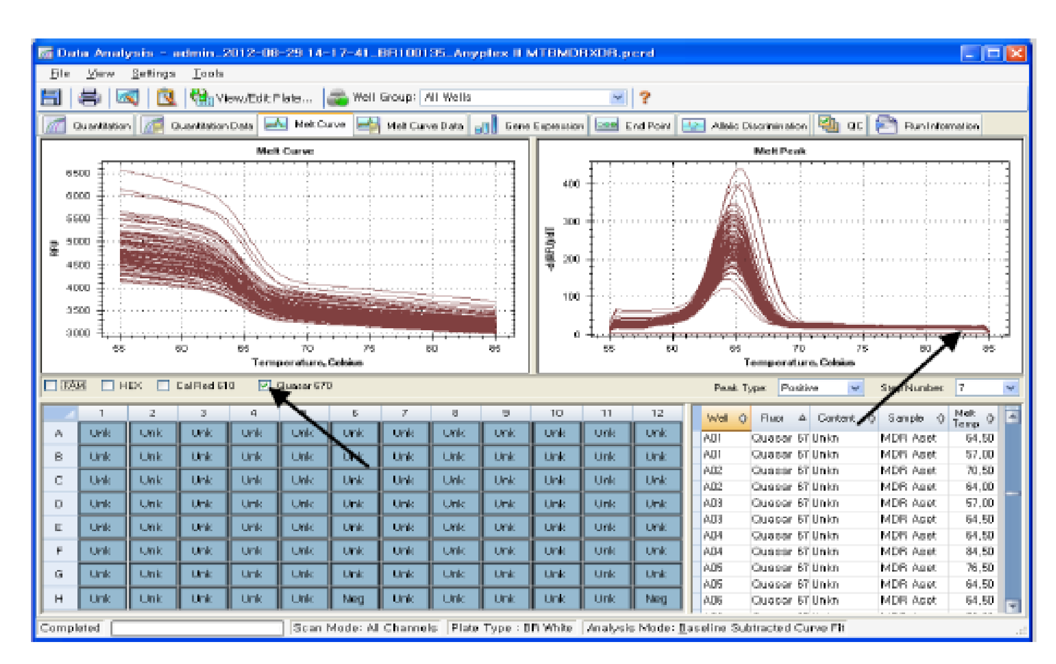
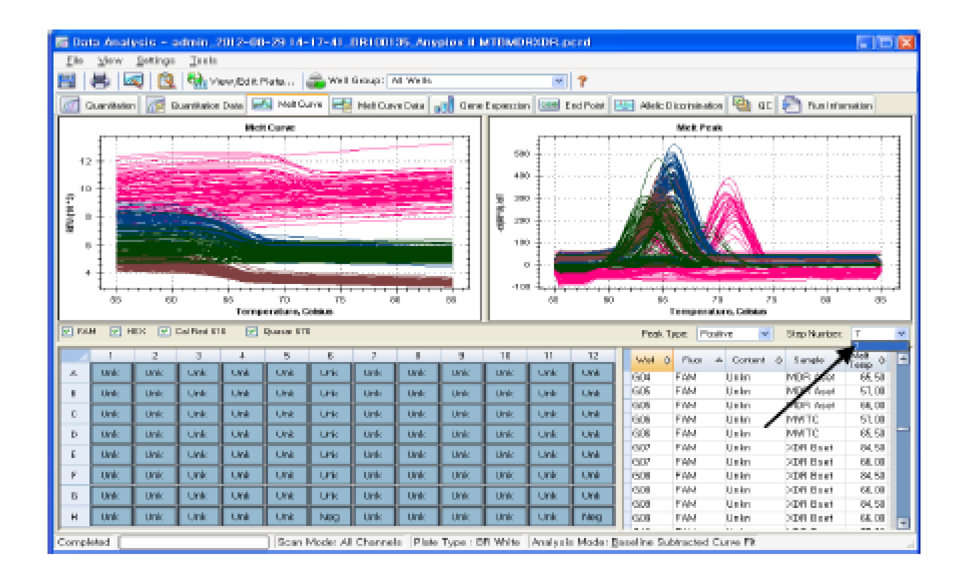


Fig.10 Pico de fusión, umbra de Quasar 670.

3. Haga click sobre **Step number "7"** y seleccione exportar todas las hojas de datos a Excel de **herramientas del menú**.





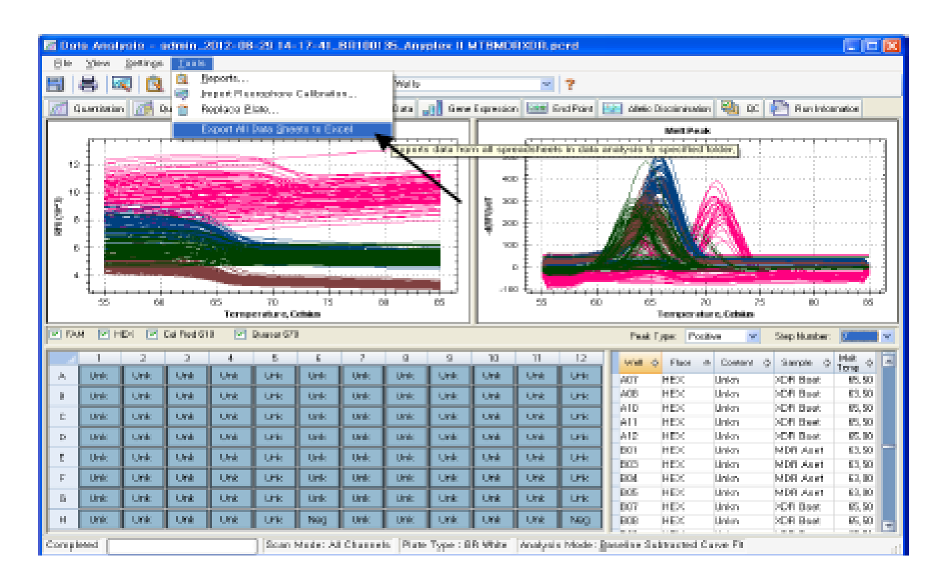


Fig. 11 Exportar todas las hojas de datos a Excel.

4. Guarde el resultado en el archivo especificado, cuando una ventana nueva esté abierta.



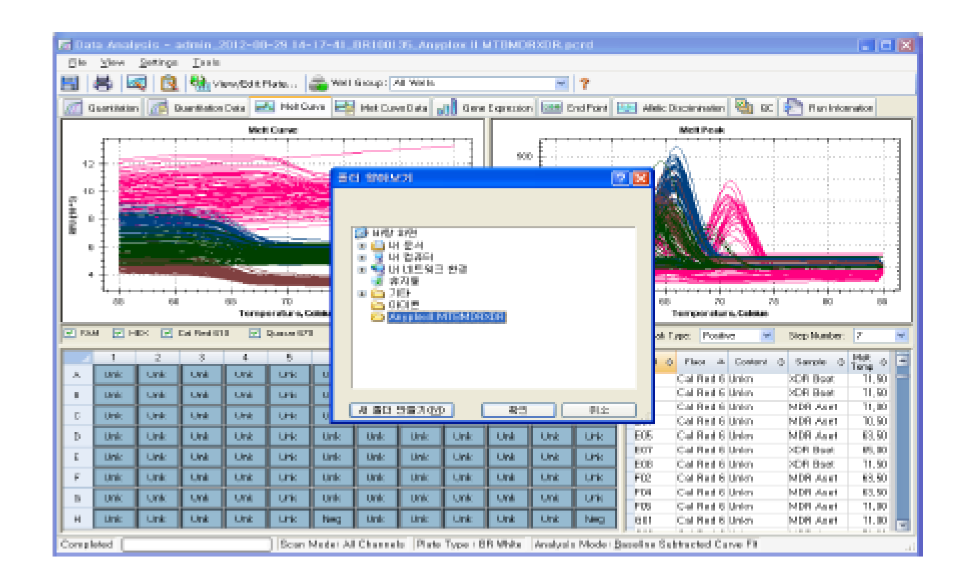


Fig. 12 Exportar todos los datos desde las hojas de cálculo en análisis de datos a un folder diseñado.

5.) Asegúrese que el resultado haya sido guardado en el archivo.

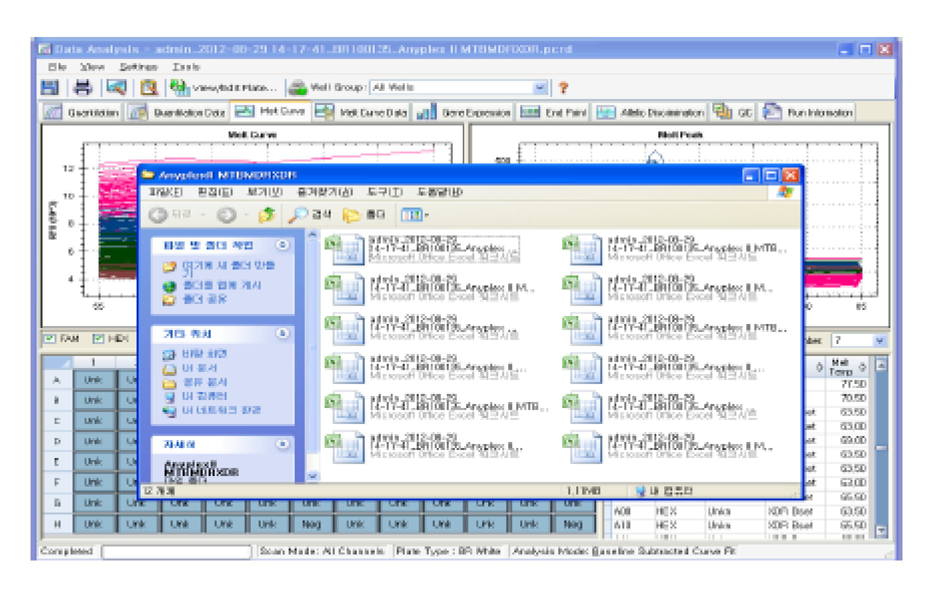


Fig. 13 Archivos de resultados exportados.

B. Ajustes para análisis de datos en el visor de Seegene.



1. Abra el programa Visor de Seegene en la pantalla, y haga click en abrir para encontrar el archivo guardado.

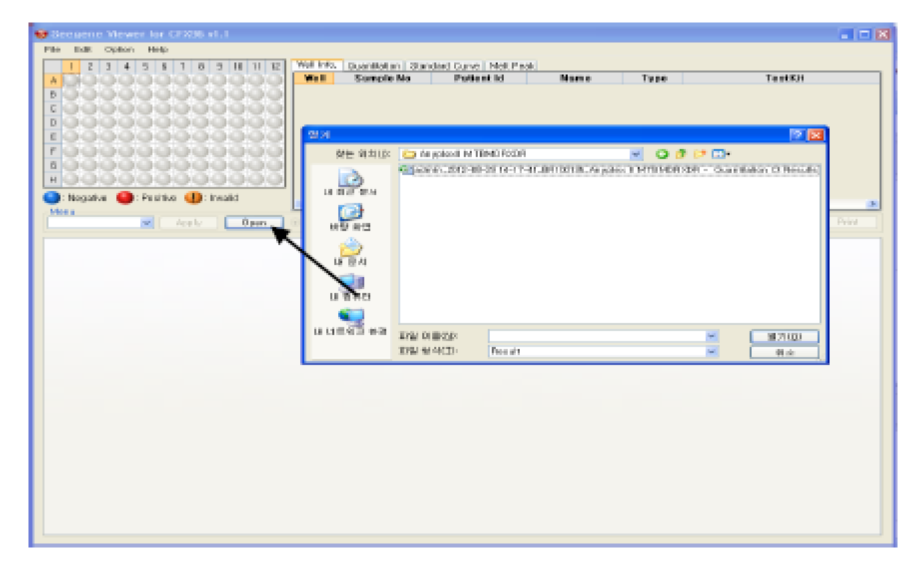


Fig. 14 Visor de Seegene.

2. Después de abrir los resultados archivados,
   (1) Arrastre los pozos muestra.
   (2) Haga click en la columna menú, y seleccione Anyplex II MTB/MDR/XDR en el listado.
   (3) Haga click en Aplicar y obtenga el resultado final.

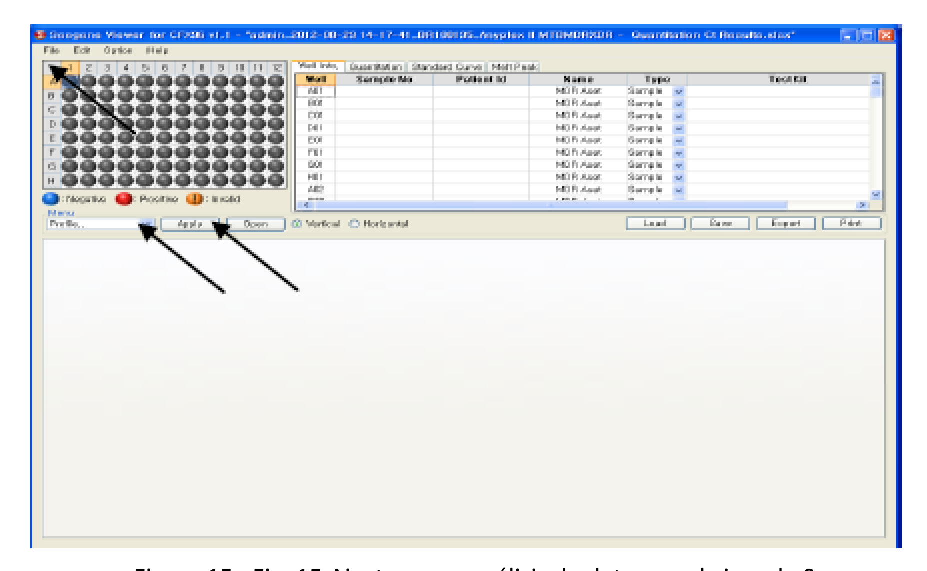


Figura 15. Fig. 15 Ajustes para análisis de datos en el visor de Seegene.



3. Revise el resultado para cada pozo.

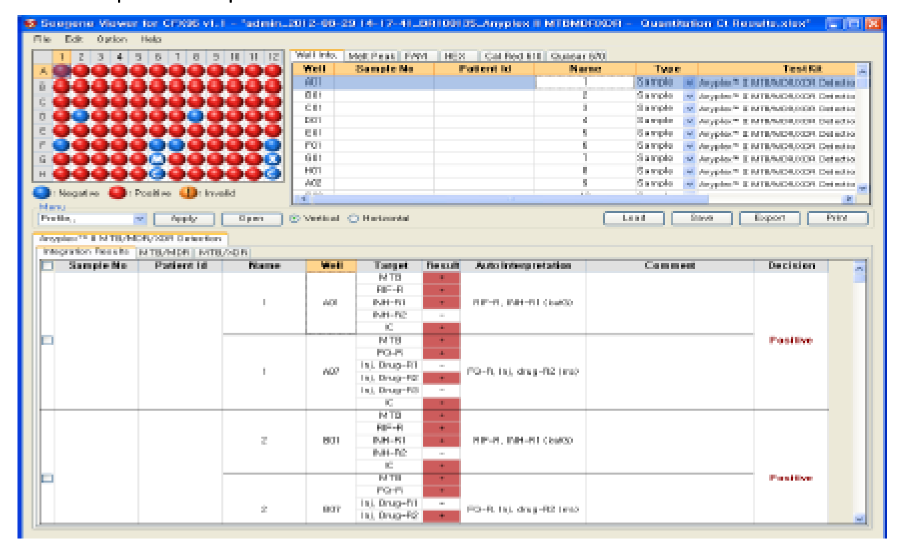
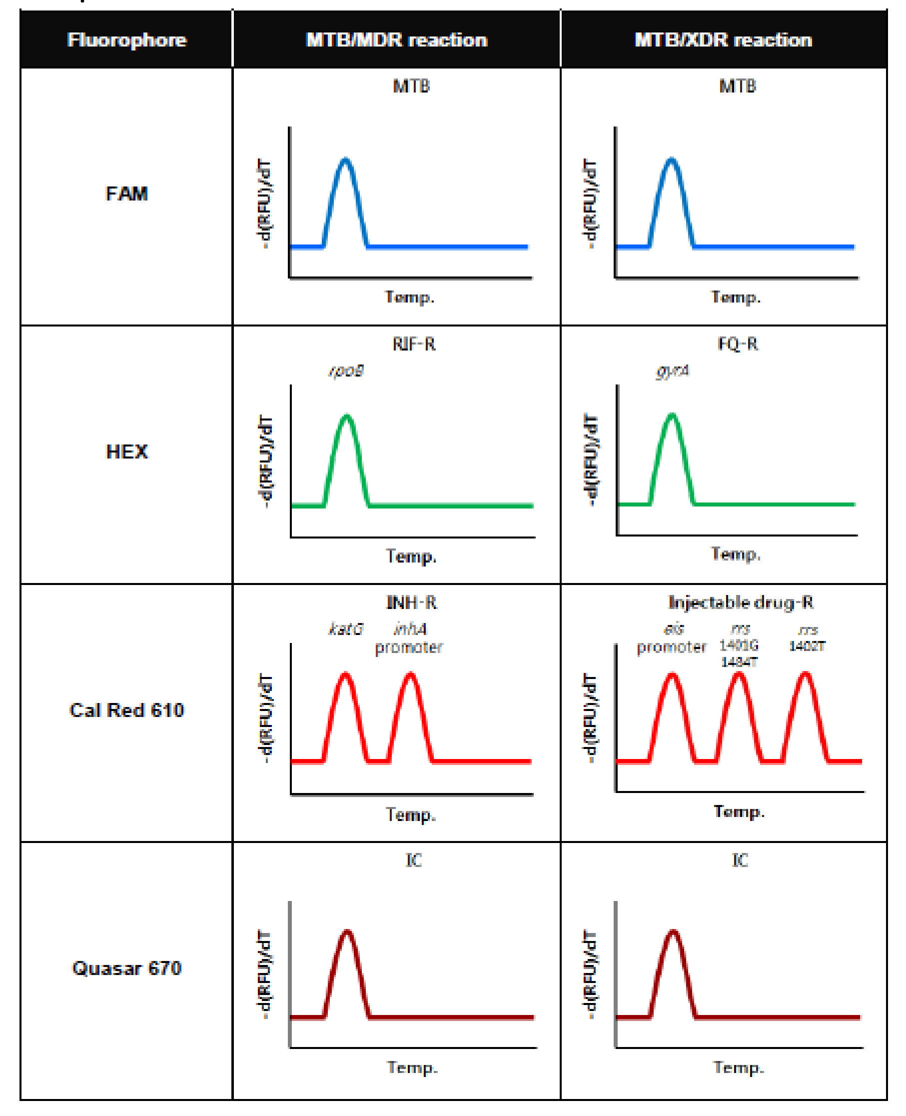


Fig. 16 Resultados de la prueba en el visor de Seegene.

RESULTADOS



1. **Diagrama esquemático de los resultados:**



2. Información de Anualitos:

2.1 Reacción MTB/MDR

FLUOROFORO	ANALITO	RESULTADO EN EL VISOR DE SEEGENE
FAM	MTB	MTB
HEX	RIF-R (18 mutations in rpoB)	RIF-R
Cal Red 610	INH-R (4 mutations in katG)	INH-R1 (katG)
	INH-R (3 mutations in inhA promoter)	INH-R2 (inhA)
Quasar 670	IC	IC

2.2 Reacción MTB/XDR

FLUOROFORO	ANALITO	RESULTADO EN EL VISOR DE SEEGENE
FAM	MTB	MTB
HEX	FQ-R (7 mutations in gyrA)	FQ-R
Cal Red 610	Inj. drug-R (3 mutations in eis promoter)	Inj. drug-R1 (eis)
	Inj. drug-R (2 mutations in rrs: 1401G & 1484T)	Inj. drug-R2 (rrs)
	Inj. drug-R (1 mutation in rrs: 1402T)	Inj. drug-R3 (rrs 1402T)
Quasar 670	IC	IC



3. Interpretación de Resultados

3.1. Reacción MTB/MDR

Caso	Resultado				Interpretación
	IC (Quasar 670)	MTB (FAM)	RIF-R (HEX)	INH-R (Cal Red 610)	
1	+	+	+	+	INH-R & RIF-R detectado
2			+	-	RIF-R detectado
3			-	+	INH-R detectado
4			-	-	MTB detectado
5		-	+	+	Inválido [1)]
6			+	-	Inválido [1)]
7			-	+	Inválido [.1)]
8			-	-	MTB no detectado
9	-	+/-	+/-	+/-	Inválido [2)]

1) La repetición de ensayos se debería realizar con el ADN original. Si el mismo resultado es obtenido refiérase a los resultados de otros métodos diagnósticos.
2) La repetición de ensayos se debe realizar con el ADN diluido de 1/10 a 1/100.

3.2 Reacción MTB/XDR



<table>
<tr><th rowspan="2">Caso</th><th colspan="4">Resultados</th><th rowspan="2">Interpretación</th></tr>
<tr><th>IC (Quasar 670)</th><th>MTB (FAM)</th><th>FQ-R (HEX)</th><th>Inj. drug-R (Cal Red 610)</th></tr>
<tr><td>1</td><td rowspan="8">+</td><td rowspan="4">+</td><td>+</td><td>+</td><td>FQ-R & Inj. drug-R detectada</td></tr>
<tr><td>2</td><td>+</td><td>-</td><td>FQ-R detectada</td></tr>
<tr><td>3</td><td>-</td><td>+</td><td>Inj. drug-R detectada</td></tr>
<tr><td>4</td><td>-</td><td>-</td><td>MTB detectada</td></tr>
<tr><td>5</td><td rowspan="4">-</td><td>+</td><td>+</td><td>Inválido [1)]</td></tr>
<tr><td>6</td><td>+</td><td>-</td><td>Inválido [1)]</td></tr>
<tr><td>7</td><td>-</td><td>+</td><td>Inválido [1)]</td></tr>
<tr><td>8</td><td>-</td><td>-</td><td>MTB no detectado</td></tr>
<tr><td>9</td><td>-</td><td>+/-</td><td>+/-</td><td>+/-</td><td>Inválido [2)]</td></tr>
</table>

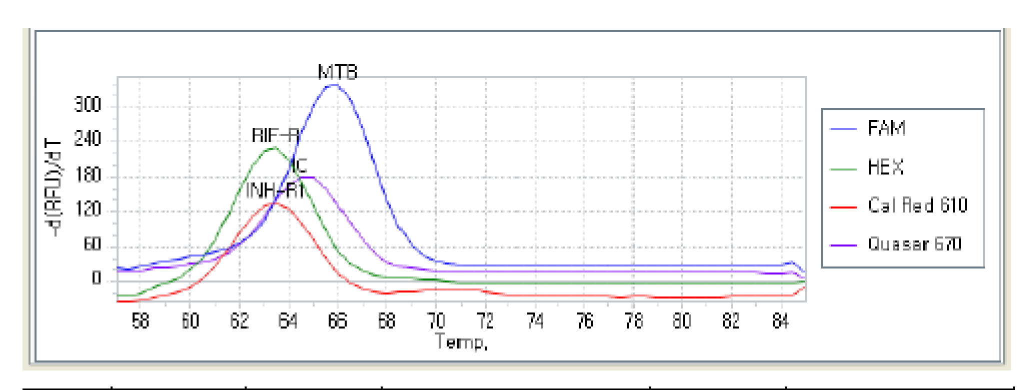
1) La repetición de ensayos se debería realizar con el ADN original. Si el mismo resultado es obtenido refiérase a los resultados de otros métodos diagnósticos.
2) La repetición de ensayos se debe realizar con el ADN diluido de 1/10 a 1/100.

4. Aplicación a muestras clínicas



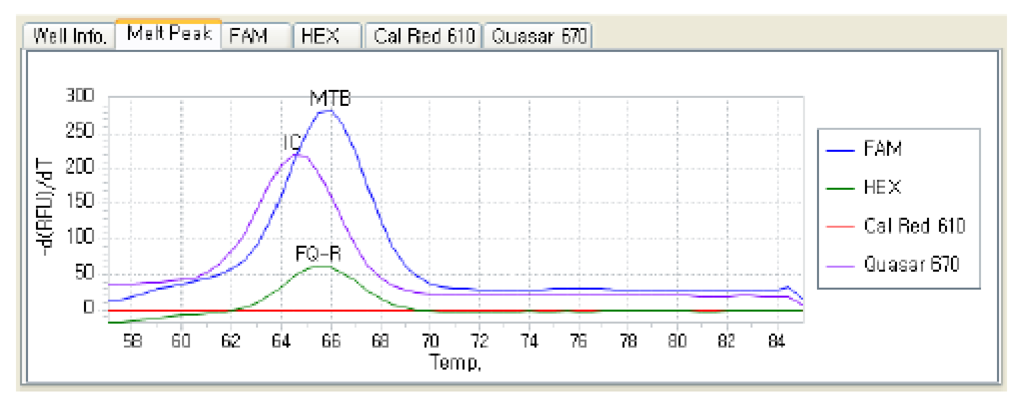
Muestra 1

Reacción MTB/MDR



Name	FAM	HEX	Cal Red 610		Quasar 670	Auto interpretation
	MTB	RIF-R	INH-R1	INH-R2	IC	
1	+	+	+	-	+	RIF-R, INH-R1 (katG)

Reacción MTB/XDR

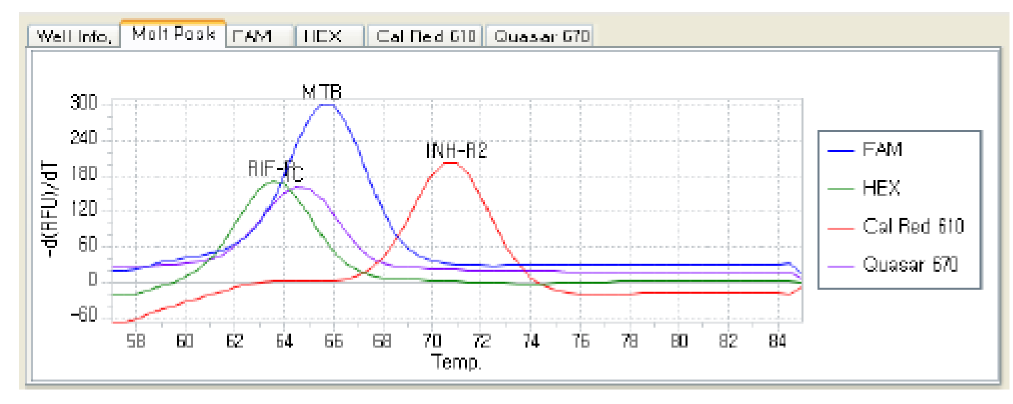


Name	FAM	HEX	Cal Red 610			Quasar 670	Auto interpretation
	MTB	FQ-R	Inj. drug-R1	Inj. drug-R2	Inj. drug-R3	IC	
1	+	+	-	-	-	+	FQ-R

Muestra 2

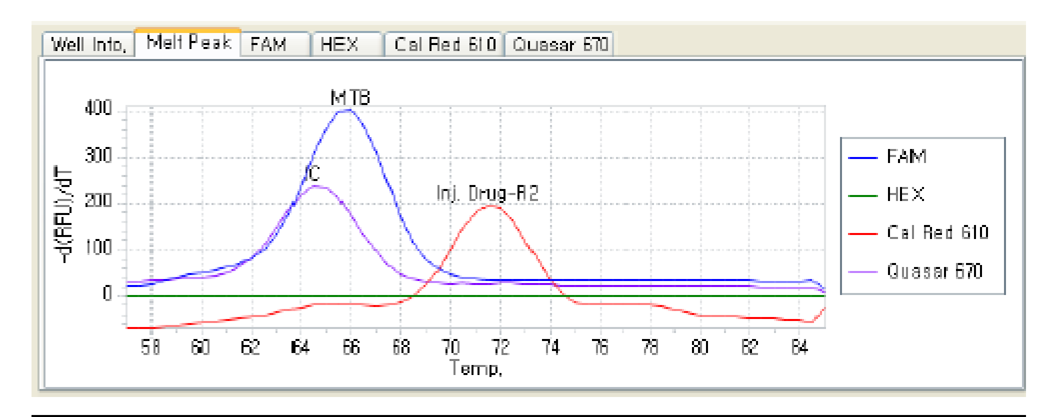


Reacción MTB/MDR



Name	FAM	HEX	Cal Red 610		Quasar 670	Auto interpretation
	MTB	RIF-R	INH-R1	INH-R2	IC	
2	+	+	-	+	+	RIF-R, INH-R2 (inhA)

Reacción MTB/XDR

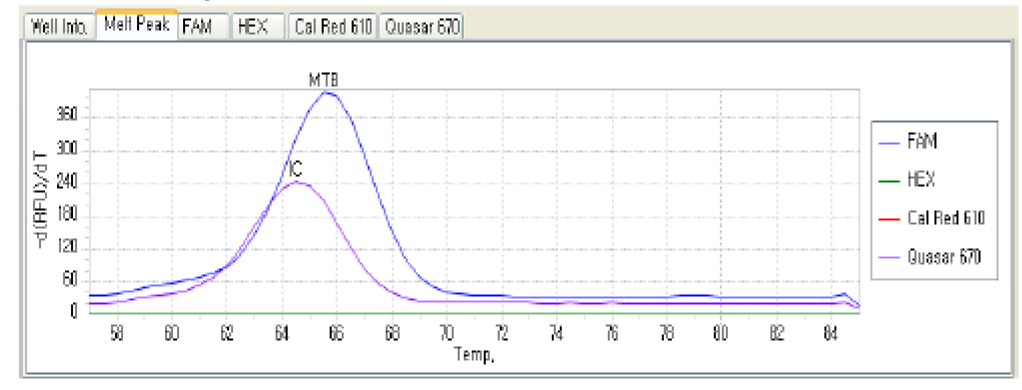


Name	FAM	HEX	Cal Red 610			Quasar 670	Auto interpretation
	MTB	FQ-R	Inj. drug-R1	Inj. drug-R2	Inj. drug-R3	IC	
2	+	-	-	+	-	+	Inj. drug-R2 (rrs)

Muestra 3

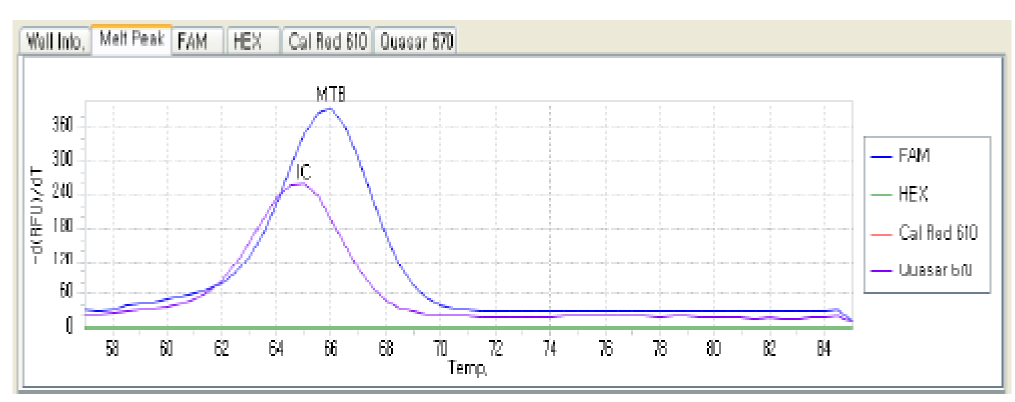


Reacción MTB/MDR



Name	FAM	HEX	Cal Red 610		Quasar 670	Auto interpretation
	MTB	RIF-R	INH-R1	INH-R2	IC	
3	+	-	-	-	+	MTB

Reacción MTB/XDR

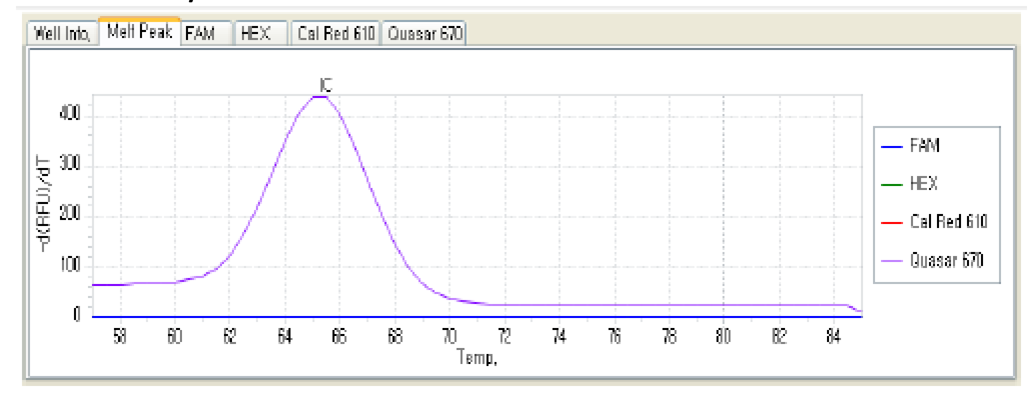


Name	FAM	HEX	Cal Red 610			Quasar 670	Auto interpretation
	MTB	FQ-R	Inj. drug-R1	Inj. drug-R2	Inj. drug-R3	IC	
3	+	-	-	-	-	+	MTB

Muestra 4

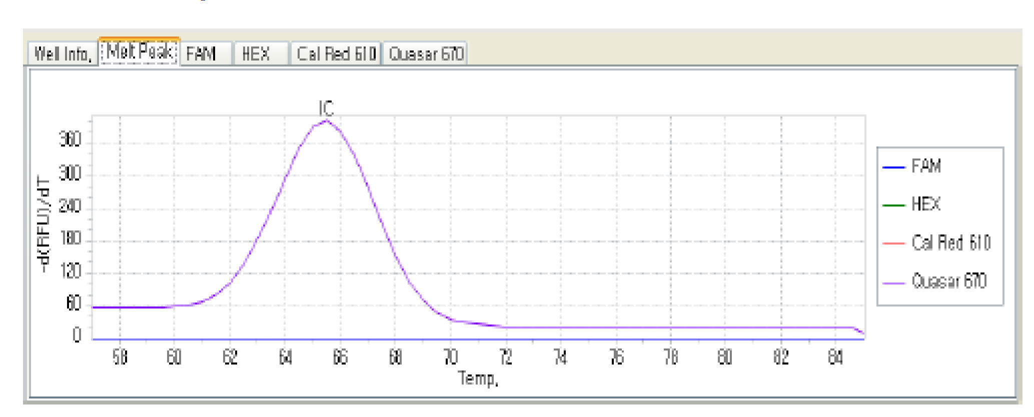


Reacción MTB/MDR



Name	FAM	HEX	Cal Red 610		Quasar 670	Auto interpretation
	MTB	RIF-R	INH-R1	INH-R2	IC	
4	-	-	-	-	+	-

Reacción MTB/XDR

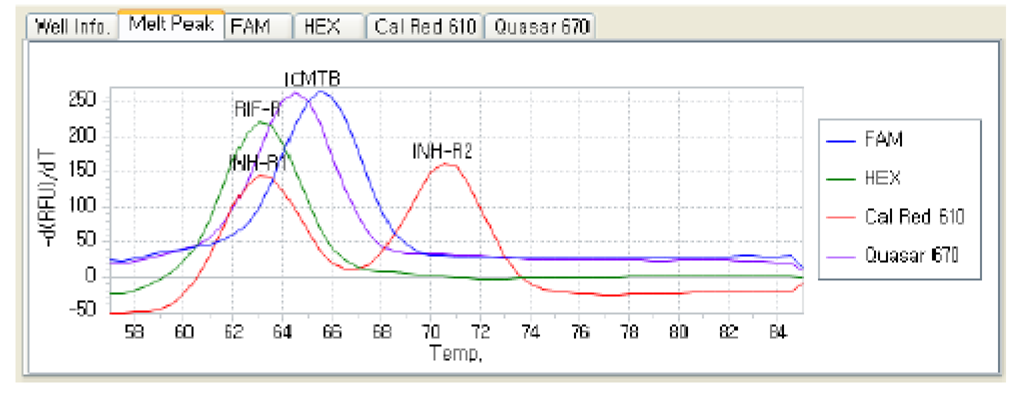


Name	FAM	HEX	Cal Red 610			Quasar 670	Auto interpretation
	MTB	FQ-R	Inj. drug-R1	Inj. drug-R2	Inj. drug-R3	IC	
4	-	-	-	-	-	+	-



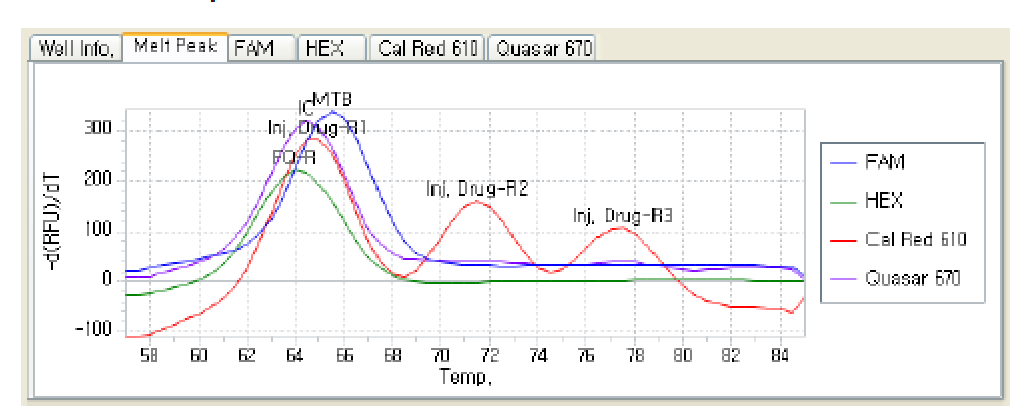
Control Positivo

Reacción MTB/MDR



Name	FAM	HEX	Cal Red 610		Quasar 670	Auto interpretation
	MTB	RIF-R	INH-R1	INH-R2	IC	
MDR PC	+	+	+	+	+	Positive Control (+)

Reacción MTB/XDR



Name	FAM	HEX	Cal Red 610			Quasar 670	Auto interpretation
	MTB	FQ-R	Inj. drug-R1	Inj. drug-R2	Inj. drug-R3	IC	
XDR PC	+	+	+	+	+	+	Positive Control (+)



SOLUCION DE PROBLEMAS

ANYPLEX MTB/MDR/XDR DETECCION		
OBSERVACION	**CAUSA PROBABLE**	**SOLUCIÓN**
No hay señal	Almacenamiento incorrecto de los kits, o expiración de la fecha de validez del kit	Verifique las condiciones de almacenamiento, y fecha de vencimiento de los reactivos, repita el ensayo con kits nuevos si es necesario.
	Los fluoróforos para análisis de datos no cumplen con el protocolo.	Seleccione los fluoróforos correctos para el análisis de datos.
	Programación incorrecta del termociclador de tiempo real.	Repita el procedimiento de detección con una configuración correcta.
No hay señal del control interno.	Alta carga del ácido nucleico del patógeno.	Si la señal del blanco es observada, es probable que sea positiva para el patógeno, aunque la señal del control interno no se observe. Si desea verificar el control interno, diluya la muestra en PBX (10-100X), y repita el paso de extracción con la muestra diluida.
	Presencia de inhibidores de PCR.	Diluya la muestra en PBS (10-100X), y repita el paso de extracción.
Falsos positivos o señal observada en el control negativo.	Presencia de contaminación cruzada.	Descontamine todas las superficies e instrumentos con hipoclorito de sodio y etanol. Use solo puntas con filtro durante el procedimiento de extracción. Cambie puntas entre tubos. Repita el procedimiento de extracción de ácidos nucleicos con un nuevo set de reactivos.
Falso negativo o no se observa señal en los controles positivos.	Toma de muestra incorrecta	Tome una nueva muestra.
	Almacenamiento inapropiado de las muestras	Tome una nueva muestra y repita el procedimiento completo, Asegure que la muestra sea almacenada en las condiciones apropiadas.



ANYPLEX MTB/MDR/XDR DETECCION

OBSERVACION	CAUSA PROBABLE	SOLUCIÓN
Falso negativo o no se observa señal en los controles positivos.	Error en la extracción de ácido nucleico.	Repita la extracción del ácido nucleico.
	Error en la adición del ácido nucleico al tubo de PCR correspondiente.	Cuidadosamente repita la prueba.
	Presencia de inhibidores.	Diluya la muestra en PBS (10-100X) y repita el paso de extracción con la muestra diluida.
	Intercambio de muestras de ácidos nucleicos.	Cuidadosamente repita la prueba.
Mensaje de error en el visor de Seegene.	El control tipo silvestre no es identificado.	Seleccione los fluoroforos correctos para análisis de datos.
	El resultado de la prueba del control tipo silvestre es anormal.	El mensaje de error se muestra en los siguientes casos: (i) valor de la altura del pico de fusión superior al máximo valor umbral fijado en los canales HEX y/o Cal Red 610; (ii) valor de la altura del pico de fusión es inferior al valor umbral fijado en los canales FAM y/o Quasar 670. El caso (i) se debe a contaminación de reactivos o espacios, verifique si hubo contaminación. El caso (ii) puede ocurrir por error en la preparación de la mezcla de reacción o en la configuración del termociclador y por al almacenamiento incorrecto del kit, por favor repita cuidadosamente la prueba y chequee las condiciones de almacenamiento.

REFERENCIAS

1. Chun, J. Y., Kim, K. J., Hwang, I. T., Kim, Y. J., Lee, D. H., and Lee, I. K. [Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene] Nucleic Acids Res. (2007) 35: e40
2. Da Silva, P. E. A. and Palomino, J. C. [Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs] J. Antimicrob. Chemother. (2011) 66: 1417-1430
3. Georghiou, S. B., Magana, M., Garfein, R. S., Catanzaro, D. G., Catanzaro, A., and Rodwell, T. C. [Evaluation of genetic mutations associated with *Mycobacterium tuberculosis* resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review] PLoS ONE (2012) 7(3): e33275
4. Gikalo, M. B., Nosoca, E. Y., Krylova, L. Y., Moroz, A. M. [The role of *eis* mutations in the development of kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Moscow region] J. Antimicrob. Chemother. (2012) 67(9): 2017-2109
5. Johnson, R., Streicher, E. M., Louw, G. E., Warren, R. M., van Helden, P. D., and Victor, T. C. [Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*] Curr. Issues Mol. Biol. (2006) 8(2): 97-111
6. Maus, C. E, Plikaytis, B. B., and Shinnick, T. M. [Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*] Antimicrob. Agents Chemother. (2005) 49(8): 3192-3197
7. Medappa, N. and Srivastava, V. K. [What is new in the diagnosis of tuberculosis?] ICMR Bulletin (2002) 32
8. Merza, M. and Masjedi, M. R. [Extensively drug resistant tuberculosis (XDR) and extremely drug resistant tuberculosis (XXDR): risk factors and molecular perspectives] Iranian J. Clin. Infect. Dis. (2010) 5(3): 174-188
9. Migliori, G. B., Dheda, K., Centis, R., Mwaba, P., Bates, M., O'Grady, J., Hoelscher, M., and Zumla, A. [Review of multidrug-resistant and extensively drug-resistant TB: global perspectives with a focus on sub- Saharan Africa] Trop. Med. Int. Health (2010) 15(9): 1052-1066
10. Qi, Y. C., Ma, M. J., Li, D. J., Chen, M. J., Lu, Q. B., Li, X. J., Li, J. L., Liu, W., and Cao, W. C. [Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in multi-ethnic region, Xinjiang Uygur Autonomous region, China] PLoS ONE (2012) 7(2): e32103
11. Santos, L. C. [Review: the molecular basis of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*] J. Med. Microbiol. (2012) 2(1): 24-36
12. Yuan, X., Zhang, T., Kawakami, K., Zhu, J., Li, H., Lei, J., and Tu, S. [Molecular characterization of multidrug and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Jiangxi, China] J. Clin. Microbiol. (2012) 50(7): 2403-2413
13. World Health Organization. [Global tuberculosis control] WHO Report (2011) WHO/HTM/TB/2011.16
14. World Health Organization. [Towards universal access to diagnosis and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis by 2015] WHO Progress Report (2011) WHO/HTM/TB/2011.3

EXPLICACION DE SIMBOLOS

Explicación de símbolos usados en la etiqueta y en el manual.

Símbolo	Explicación
IVD	Para Diagnóstico in vitro
LOT	Número de Lote
REF	Número de catálogo
	Fecha de vencimiento
	Temperatura de Almacenamiento
	Precaución
PRIMER	Mezcla de oligonucleotidos para amplificación y detección
WATER	Agua libre de Rnasas
CONTROL +	Control Positivo
CONTROL W	Control tipo silvetre
PREMIX	Mezcla Maestra para PCR Anyplex
	Fabricante
	Fecha de fabricación
i	Consulte instrucciones de uso



INFORMACION PARA PEDIDOS

Cat. No.	Producto	Presentación
Anyplex™ II TB series		
TB7500Y	Anyplex™ II MTB/MDR/XDR Detection	50 rxns
Seeplex® TB series		
TB1110Y	Seeplex® MTB/NTM ACE Detection	50 rxns
TB2110Y	Seeplex® MTB Nested ACE Detection	50 rxns
TB6100Y	Seeplex® MTB ACE Detection	50 rxns
ScreenTape® System		
ST007	TapeStation	1 ea
ST105	DS12 ScreenTape (16 lane tape)	112T
ST214	ScreenTape Loading Tips (16 lane tape)	3,840 tips/pack
Anyplex™ TB series		
TB7200X	Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection	100 rxns

Note: 80 rxns for SmartCycler® II System

Cat. No.	Producto	Presentación
Anyplex™ plus TB series		
TBP7200X	Anyplex™ plus MTB/NTM Detection	100 rxns
TBP7201Z	Anyplex™ plus MDR-TB Detection	25 rxns